

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/63071 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. Dezember 1999 (09.12.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/01684 (22) Internationales Anmeldedatum: 2. Juni 1999 (02.06.99) (30) Prioritätsdaten: 198 24 811.3 3. Juni 1998 (03.06.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ROTHBARTH, Karsten [DE/DE]; Im Brünnele 20, D-69493 Hirschberg (DE). STAMMER, Hermann [DE/DE]; Linsenhühl 3, D-69221 Dossenheim (DE). WERNER, Dieter [DE/DE]; Neuer Weg 22, D-69118 Heidelberg (DE). (74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: METHOD FOR TRIGGERING APOPTOSIS IN CELLS (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR AUSLÖSUNG VON APOPTOSE IN ZELLEN (57) Abstract <p>The invention relates to a method for triggering apoptosis, whereby the C1D gene in cells, more particularly, in tumor cells, is overexpressed. This occurs, for instance, by introducing corresponding expression constructs in the cells or by exogenous stimulation of the expression of the cell's own C1D gene.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Auslösung von Apoptose, in dem in Zellen, insbesondere Tumorzellen, das C1D-Gen überexprimiert wird. Dies geschieht beispielsweise durch Einbringen entsprechender Expressionskonstrukte in die Zellen oder durch exogene Stimulation der Expression des zelleigenen C1D-Gens.</p>		

Unser Zeichen: K 2686 - hu / sch / msl

Verfahren zur Auslösung von Apoptose in Zellen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Auslösung von Apoptose in Zellen, insbesondere Tumorzellen.

Apoptose ist der programmierte Zelltod. Dieser unterliegt einer genauen Regulation, wobei Apoptose induziert bzw. inhibiert werden kann.

Die Induktion von Apoptose kann bekanntermaßen über eine Reihe von sog. Todesrezeptoren, d.h. Rezeptoren, die eine "Death Domain" (DD) enthalten, wie CD95, TNF-RI, DR3, DR4 oder DR5, erfolgen, die nach Bindung ihrer Liganden Apoptose-Signalwege induzieren. Beispielsweise interagiert nach Bindung des CD95-Liganden der CD95-Rezeptor mit dem Adapterprotein FADD/MORT1, wodurch das "Recruitment" und die Aktivierung der Protease FLICE/Caspase-8, am DISC "Death Inducing Signalling Complex" induziert werden. FADD und FLICE enthalten jeweils "Death Effector Domains" (DED). Die Induktion der Apoptose über diese Apoptose-Signalwege ist von außen beispielsweise durch die Gabe von Zellgiften (cytotoxischen Substanzen), Bestrahlung, Viren, Entzug von Wachstumsfaktoren oder mechanische Zellverletzung möglich. Diese Möglichkeiten der Apoptose-Induktion sind allerdings von bestimmten Nachteilen begleitet. So führt die Gabe von Zellgiften, wie Zytostatika, oder die Bestrahlung bei Krebszellen zur Resistenzentwicklung und darüberhinaus zu einer Schädigung normaler Zellen, bei denen eigentlich keine Apoptose ausgelöst werden sollte.

So besteht die Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, ein Verfahren bereitzustellen, mit der Apoptose, z.B. zur Bekämpfung von malignem Wachstum, unter Reduktion der oben beschriebenen Nebenwirkungen ausgelöst werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den

Patentansprüchen erreicht.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen der Erfinder, daß in Tieren, besonders Säugetieren ganz besonders dem Menschen, ein Protein vorliegt, das sich zur Induktion von Apoptose eignet. Ein solches Protein weist eine Größe von ca. 16 kD auf und wurde bisher als DNA-bindendes Protein charakterisiert (Nehls et al., Nucleic Acids Research, 26, S. 1160-1166 (1998)).

Von den Erfindern wurde erkannt, daß das zur Induktion von Apoptose geeignete Protein (nachstehend mit C1D bezeichnet) in jeder Zelle, auch in Tumorzellen vorhanden ist, und dort in einer vom Organismus vorgegebenen Menge exprimiert wird. Kommt es zu einer Überexpression des C1D-Genprodukts, wird in den überexprimierenden Zellen Apoptose ausgelöst. Aber gerade in Tumorzellen ist eine durch Überexpression erzielte Apoptose wünschenswert. Diese Überexpression kann per se die Tumorzellen abtöten. Weiter könnte sie die durch die übliche Tumorbehandlung, wie Chemotherapie oder Bestrahlung, bewirkte Apoptose verstärken. Außerdem könnte in Tumorzellen Apoptose bewirkt werden, bei denen sich durch übliche Behandlungswege schon eine Resistenz entwickelt hat. Von den Erfindern wurde jetzt herausgefunden, daß die Auslösung von Apoptose dadurch bewirkt werden kann, daß das C1D-Gen zur Überexpression gebracht wird, d.h. die Konzentration der zellulären C1D-Genprodukts erhöht wird. Dies kann beispielsweise dadurch geschehen, daß die Zellen mit Expressionskonstrukten transfiziert werden, die das C1D-Gen exprimieren oder das endogene C1D-Gen zur Überexpression stimuliert wird.

Das C1D-Genprodukt umfaßt die Sequenz von Fig. 1 bzw. 2 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz. Der Ausdruck "eine durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz" umfaßt jegliche für ein C1D-(verwandtes) Protein kodierende Aminosäuresequenz, deren DNA-Sequenz mit der DNA von Fig. 1 bzw. 2 hybridisiert. Bezüglich des Begriffs "hybri-

disiert" wird auf die nachstehenden Ausführungen verwiesen.

Für die Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist insbesondere eine für C1D kodierende Nukleinsäure in Form einer DNA, insbesondere cDNA, geeignet. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

- (a) Die DNA von Fig. 1 bzw. 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, wobei letztere DNA mit der DNA von Fig. 1 oder 2 hybridisiert, oder
- (b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Die Sequenzdaten der C1D cDNAs gemäß Fig. 1 bzw. 2 sind in der Genbank unter den folgenden Accessionnummern verfügbar:

Maus cDNA: X95591;

Mensch cDNA: X95592

Der Ausdruck "eine durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA" umfaßt jegliche für ein C1D-(verwandtes) Protein kodierende DNA-Sequenz, die mit der DNA von Fig. 1 oder 2 hybridisiert. Die DNA kann sich von der DNA von Fig. 1 oder 2 durch Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von ein oder mehreren Basenpaaren oder andere im Stand der Technik bekannte Modifikationen, z.B. alternatives Splicing, unterscheiden. Erfindungsgemäß umfaßt der Begriff "DNA" auch Fragmente dieser DNA. Der Begriff "Fragment" soll einen Ausschnitt bzw. Segment des ursprünglichen Nucleinsäuremoleküls umfassen, wobei das durch dieses Fragment codierte Protein noch die Apoptose auslösenden Eigenschaften von C1D aufweist. Dazu zählen auch Allelvarianten. Verfahren zur Erzeugung der vorstehenden Änderungen in der Nucleinsäuresequenz sind dem Fachmann bekannt und in Standardwerken der Molekularbiologie beschrieben, beispielsweise in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989).

Der Fachmann ist auch in der Lage zu bestimmen, ob ein von einer so veränderten Nucleinsäuresequenz codiertes Protein noch über die biologische Aktivität der Apoptose-Induktion verfügt, z.B. durch Nachweis von Apoptose-typischem Zelltod gekennzeichnet durch z.B. Morphologie, multizentrische Chromatinkondensation, typische Membranveränderungen und endogene DNA-Degradation.

Der Ausdruck "DNA mit hybridisiert" weist auf eine DNA hin, die unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, mit einer DNA von Fig. 1 bzw. 2 hybridisiert. Der Begriff "hybridisieren" bezieht sich dabei auf konventionelle Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise auf Hybridisierungsbedingungen, bei denen als Lösung 5xSSPE, 1% SDS, 1xDenhardts-Lösung verwendet wird und die Hybridisierungstemperaturen zwischen 35°C und 70°C, vorzugsweise bei 65°C liegen. Nach der Hybridisierung wird vorzugsweise zuerst mit 2xSSC, 1% SDS und danach mit 0,2xSSC bei Temperaturen zwischen 35°C und 70°C, vorzugsweise bei 65°C gewaschen (zur Definition von SSPE, SSC und Denhardts-Lösung siehe Sambrook et al., supra). Besonders bevorzugt sind stringente Hybridisierungsbedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al ., supra, beschrieben sind.

Um das C1D-Genprodukt herzustellen, das zur Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahren geeignet ist, wird die für C1D kodierende DNA in einen Vektor bzw. Expressionsvektor inseriert, z.B. pBlueScript, pQE8, pUC- oder pBr322-Derivate. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül im Vektor mit regulatorischen Elementen funktionell verknüpft, die dessen Expression in eukaryotischen Wirtszellen erlauben. Solche Vektoren enthalten neben den regulatorischen Elementen, beispielsweise einem Promotor, typischerweise einen Replikationsursprung und spezifische Gene, die die phänotypische Selektion einer transformierten Wirtszelle erlauben. Zu den regulatorischen Elementen für die Expression in Eukaryonten zählen der CMV-, SV40-, RVS-40-Promotor, sowie CMV- oder SV40-Enhancer. Weitere Beispiele für

geeignete Promotoren sind der Metallothionein I- und der Polyhedrin-Promotor.

In einer für gentherapeutische Zwecke bevorzugten Ausführungsform ist der die C1D-DNA enthaltende Vektor ein Virus, beispielsweise ein Adenovirus, Vaccinia-Virus oder Adeno-abhängige Parvoviren (AAV). Besonders bevorzugt sind Retroviren. Beispiele für geeignete Retroviren sind MoMuLV, HaMuSV, MuMTV, RSV oder GaLV. Für Zwecke der Gentherapie können die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle auch in Form von kolloidalen Dispersionen zu den Zielzellen transportiert werden. Dazu zählen beispielsweise Liposomen oder Lipoplexe (Mannino et al., Biotechniques 6 (1988), 682).

Allgemeine auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren können zur Konstruktion von Expressions- und insbesondere Gentherapievektoren, die die oben genannten Nucleinsäuremoleküle und geeignete Kontrollsequenzen enthalten, verwendet werden. Zu diesen Verfahren zählen beispielsweise in vitro-Rekombinationstechniken, synthetische Verfahren, sowie in vivo-Rekombinationsverfahren, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., supra, beschrieben sind. Der Fachmann weiß somit, in welcher Weise eine erfindungsgemäße DNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße DNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann. Beispielsweise in Form eines Fusionsproteins, bei dem der andere Teil GFP (das grün fluoreszierende Protein von *Aequorea Victoria*) ist.

Für die Expression des C1D-Gens werden die oben genannten Expressionsvektoren in Wirtszellen eingeführt. Zu diesen Wirtszellen zählen Tierzellen, vorzugsweise Säugerzellen, sowohl in Kultur wie auch im lebenden Organismus. Bevorzugt sind die tierischen Zellen L, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa. Verfahren zur Transformation dieser Wirtszellen, zur Erkennung erfolgter Transformation und Expression der erfin-

dungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Vektoren sind auf dem Fachgebiet bekannt.

Des weiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße DNA exprimierte Protein bzw. Fusionsprotein zu isolieren und zu reinigen.

Um das erfindungsgemäße Verfahren auszuführen, wird in einer bevorzugten Ausführungsform die C1D-DNA in einen Expressionsvektor, insbesondere einen Gentherapievektor, inseriert und in Zellen, bevorzugt Tumorzellen, eingeführt. Dort kommt es zur Expression von C1D-Protein, das zusätzlich zum zelleigenen Protein, zur Auslösung von Apoptose führt. Das Einbringen der Vektoren in die Zellen erfolgt unter den dem Fachmann bekannten Bedingungen. Hinsichtlich der in-vivo Gentherapie wird insbesondere auf "K.W. Culver, Gene Therapy, A Handbook for Physicans, Mary Ann Libart, Inc., New York, 1994" und "P.L. Chang, Sonatic Gene Therapy, CRC Press, London, 1995" verwiesen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das zelleigene C1D-Gen zu einer vermehrten Expression stimuliert, z.B. durch exogene Stimulation des endogenen C1D-Promoters. Als Promoter bezeichnet man 5'-Nachbarsequenzen eines Gens, die als Startpunkte der RNA Polymerase II dienen, welche im Zusammenwirken mit Transkriptionsfaktoren die Expression des Gens bewirkt. Bei vielen Genen, wie auch bei C1D, ist dieser Prozeß durch exogene Faktoren induzierbar bzw. stimulierbar. Faktoren, die die spezifische Expression eines Gens bewirken sind sehr zahlreich und reichen von physikalischen Faktoren (wie Licht, Wärme, Kälte), über niedermolekulare anorganische Stoffe (wie Salze, Metallionen) und niedermolekulare organische Stoffe (Peptide, Nukleinsäurebausteine, biogene Amine, Steroide) bis zu höhermolekularen Stoffen (Serum, Wachstumsfaktoren, Immun-Stimulantien). Die für das C1D-Gen

spezifischen Stimulantien werden dadurch erkannt, daß 5'-Nachbarsequenzen, vorhanden auf z.B. den BAC (bacterial arteficial chromosome) Klonen mit einem Reportergen, z.B. CAT oder EGFP, kombiniert und hinsichtlich der Reportergen-Expression bzw. deren Stimulation durch exogene Faktoren, ggf. mit einem "high-throughput"-Verfahren, untersucht werden.

Somit stellt die vorliegende Erfindung erstmalig eine Möglichkeit bereit, Apoptose nicht über die üblichen Signalwege auszulösen, sondern durch Überexpression eines bestimmten Gens. Dies kann eine besondere Bedeutung bei vielen Erkrankungen haben, insbesondere Tumorerkrankungen. Insbesondere hat sich als vorteilhaft herausgestellt, daß Tumorzellen auf eine Überexpression von C1D sehr viel empfindlicher als normale Zellen reagieren. Für normale Zellen bestehen deshalb keinerlei Nebenwirkungen, während Tumorzellen den sicheren Zelltod erleiden.

Kurze Beschreibung der Figuren:

- Fig. 1** zeigt die DNA- und Aminosäuresequenz von C1D aus Mensch
- Fig. 2** zeigt die DNA- und Aminosäuresequenz von C1D aus Maus
- Fig. 3** zeigt den zeitlichen Verlauf eines durch Überexpression von C1D ausgelösten Apoptoseprozesses in Zellen des Ehrlich Ascites Tumors (Fluoreszenzmikroskopie; Anregung: 480 nm, Emission: 520 nm)
- Fig. 4** zeigt Beispiele von morphologischen Besonderheiten im Verlauf eines durch Überexpression von C1D ausgelösten Apoptoseprozesses in Zellen des Ehrlich Ascites Tumors (Phasenkontrastaufnahmen)

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Induktion von Apoptose durch Expression d s C1D-Gens

- pcDNA 3 - C1D-Expressionskonstrukte

Die im Bluescript-Vektor (KS+, Fa. Stratagene) klonierte cDNA kodierend für menschliches bzw. murines C1D wurden durch PCR amplifiziert. Dabei wurden die folgenden Primer verwendet:

für menschliche cDNA:

Primer vorwärts:

5'-GGGGTACCATGGCAGGTGAAGAAATTAATGAAGACTAT

Primer rückwärts:

5'-GGGTCGACTTAACCTTTACTTTTCCCTTTATTGGCAAC

(bewirkt Amplifikation der Nukleotidsequenz von Base 118 bis Base 540 gemäß Fig. 1)

für Maus cDNA:

Primer vorwärts:

5'-GGGGTACCATGGCAGGTGAAGAAATGAATGAAGATTAT

Primer rückwärts:

5'-GGGTCGACGTGTTTGCTTTTCCCTTTATTAGCCACTTT

(bewirkt Amplifikation der Nukleotidsequenz von Base 78 bis Base 500 gemäß Fig. 2).

Mit diesen Primern wurde eine Kpn-Schnittstelle vor dem ATG-Startcodon und eine Sal I-Restriktionsstelle vor den Stop-Kodon eingeführt (sodaß das Stopkodon entfiel). Die PCR-Reaktion wurde mittels PCR Kit der Fa. Clontech (K1906-1) nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung der Kitbestandteile in 50 µl Volumina durchgeführt:

Wasser	38,8 µl
10x Puffer	5 µl
Mg-Acetat	2,2 µl
Primer-Vor	1 µl (10 µM)
Primer-Rück	1 µl (10 µM)
C1D-Templat	5 µl (500 ng)

50x dNTP 1 μ l
Kit-Polymerase 1 μ l

Cyclerprogramm:

1. Initiale Denaturierung	94°C, 1 Min.
2. Denaturierung	94°C, 30 Sec.
3. Annealing-Extension	68°C, 3 Min.
4. End-Extension	68°C, 3 Min.
5. Abkühlung	4°C

Schritte 2/3 werden 35 mal durchgeführt

Nach Restriktionsverdau des Amplifikationsansatzes mit Kpn I/Sal I wurden die Fragmente zunächst im Bluescript-Vektor (Kpn I/Sal I - vorbehandelt) rekloniert. Nach Ausschneiden der Fragmente aus dem Bluescript-Vektor mit Kpn I/Not I konnten die Sequenzen im entsprechend vorbehandelten pcDNA 3-Vektor (Fa. InVitrogen) einkloniert werden.

- pcDNA3-C1D-EGFP-Expressionskonstrukte

Die Fusion zwischen C1D und GFP (grün fluoreszierendes Protein von Aequorea Victoria) mit durchgehendem Leserahmen erfolgte auf der pBluescript-Ebene. Dazu wurden die oben beschriebenen pBluescript-(Kpn I)-C1D-(Sal I)-Plasmide durch Verdau mit Sal I/Hind III geöffnet.

Die für EGFP kodierende Sequenz (Fa. Clontech; EGFP bedeutet "enhanced green fluorescent protein" und ist eine von der Fa. Clontech hergestellte Mutante, die verbesserte Eigenschaften hinsichtlich Excitation/Emission hat) wurde durch PCR amplifiziert. In dieser PCR wurden die folgenden Primer eingesetzt:

Primer vorwärts:

5'-GGGTCGACATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC

Primer rückwärts:

5'-CCAAGCTTTGGAATTCTAGAGTCGCGGCCGCTTTA

um am 5-Ende eine Sal I-Stelle und am 3'-Ende (hier nach dem Stopcodon) eine Hind III-Stelle einzufügen. Die PCR wurde analog wie zuvor beschrieben durchgeführt.

Nach Verdau der PCR-Amplifikationsprodukte mit Sal I und Hind

III konnten diese in die oben vorbereiteten Bluescript-(Kpn I)-C1D-(Sal I) (Hind III)-Plasmide ligiert werden. Danach wurde die Fusionskassette (Kpn I)-C1D-EGFP-(NotI) durch entsprechenden Verdau aus dem Bluescript-Vektor herausgeschnitten und in den entsprechend vorbehandelten pcDNA 3-Vektor (Kpn I/Not I) rekloniert.

- Transfektion der Vektoren in Tumorzellen

Die oben erhaltenen Expressionsvektoren wurden getrennt voneinander per Elektroporation (Potter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, S. 7161-7165 (1984) bzw. Lipofektion (SuperFect Transfection Reagent Handbook, Fa. Qiagen, Hilden, 02/97, 1997) in Zellen des Ehrlich Ascites Tumors transfiziert. Transfizierte (lebende Zellen) wurden im Mikroskop (Fluoreszenzoptik) beobachtet und fotografiert (Fig. 3).

Etwa 12 Stunden nach Transfektion haben 20-60% eine schwache Grünfluoreszenz im Zellkern (nicht gezeigt). Dies verweist auf die zunächst moderate Expression des Fusionsproteins. Morphologisch sind keine Besonderheiten zu erkennen. Ab etwa 24 Stunden nach Transfektion des Vektorkonstrukts treten in einzelnen Zellen Verdichtungen des Fusionsproteins auf (Fig. 3 links). Diese Verdichtungen sind auch im Phasenkontrastbild (Fig. 4) zu beobachten. Im weiteren zeitlichen Verlauf werden diese Verdichtungen stärker (Fig. 3 von links nach rechts) und das Phasenkontrastbild (Fig. 4) entspricht dem typischen Bild einer Zelle in Apoptose.

Nicht alle Zellen, die gleichzeitig transfiziert wurden, zeigen auch gleichzeitig die im Bild zu sehende übersteigerte Expressionsrate des Fusionsproteins. Zellen wie in Fig. 3 links werden auch noch nach 48-72 Stunden beobachtet, wohingegen andere Zellen schon den Endpunkt (Fig. 3 rechts) erreicht haben. Dies zeigt, daß die Zellen einer Kultur "gestaffelt" in den Apoptose-Prozeß eintreten. Bei ausreichend hoher Transfektionsrate sind letztlich alle Zellen einer Kultur, auch solche, die nicht transfiziert wurden, abgetötet. Dieser Zeitpunkt ist abhängig von der initialen

Transfektionsrate. Durch die Apoptose der transfizierten Zellen werden Faktoren abgegeben, die für nicht-transfizierte Zellen in der Kultur schädlich sind und schließlich zu Abtötung auch dieser nicht-transfizierten Zellen führen (sog. "Bystander-Effekt").

Es soll angemerkt werden, daß GFP (grün fluoreszierendes Protein von Aequorea Victoria) nur zur Unterscheidung transfizierter und nicht-transfizierter Zellen verwendet wurde bzw. zur Sichtbarmachung der Überexpression. GFP-Expression allein hat keinerlei Effekt auf die Zellmorphologie bzw. auf die Überlebensfähigkeit von Zellen. GFP-Fusionsproteine haben grundsätzlich die funktionellen Eigenschaften (und auch die intrazellulären Verteilungen) wie das funktionelle Genprodukt. Die in den Figuren gezeigten apoptotischen Prozesse beruhen deshalb auf einer C1D-Funktion. Die gezeigte Morphologie (und der Zellzahlverlust) wurde in Kontrollexperimenten auch durch Konstrukte bewirkt, die nur die C1D-Sequenz enthielten (z.B. durch die oben beschriebenen pcDNA 3-C1D-Expressionskonstrukte).

Patentansprüche

1. Verfahren zur Auslösung von Apoptose in Zellen durch Überexpression des C1D-Gens.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Zellen Tumorzellen sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das C1D-Genprodukt die Aminosäuresequenz von Fig. 1 bzw. 2 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz aufweist, wobei die DNA-Sequenz der letzteren Aminosäuresequenz mit der DNA von Fig. 1 bzw. 2 hybridisiert.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Zellen mit einem Expressionsvektor enthaltend
 - (a) die DNA von Fig. 1 bzw. 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, wobei letztere DNA mit der DNA von Fig. 1 bzw. 2 hybridisiert, oder
 - (b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.transfiziert werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das in den Zellen endogen enthaltene C1D-Gen stimuliert wird.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der Promotor des endogenen C1D-Gens durch extrazelluläre Faktoren stimuliert wird.

K 2686

Zusammenfassung

Verfahren zur Auslösung von Apoptose

5

10

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Auslösung von Apoptose, in dem in Zellen, insbesondere Tumorzellen, das C1D-Gen überexprimiert wird. Dies geschieht beispielsweise durch Einbringen entsprechender Expressionskonstrukte in die Zellen oder durch exogene Stimulation der Expression des zelleigenen C1D-Gens.

Nukleotidsequenz und Übersetzung der Mensch-C1D cDNA

```

CTT TCC GGG AGA CTG GAG TCG AAG GCC GTG AGT ATT TTC TAA GCC
AGT GTT TAG AGA GTA TGT GAG GCA AGA GTA CCT ATA GAA CCC GGA
GGA GGG TGA GGA GCA GAG CTG GCC ATA ATG GCA GGT GAA GAA ATT
                                     M  A  G  E  E  I
AAT GAA GAC TAT CCA GTA GAA ATT CAC GAG TAT TTG TCA GCG TTT
N   E   D   Y   P   V   E   I   H   E   Y   L   S   A   F
GAG AAT TCC ATT GGT GCT GTG GAT GAG ATG CTG AAG ACC ATG ATG
E   N   S   I   G   A   V   D   E   M   L   K   T   M   M
TCT GTT TCT AGA AAT GAG TTG TTG CAG AAG TTG GAT CCA CTT GAA
S   V   S   R   N   E   L   L   Q   K   L   D   P   L   E
CAA GCA AAA GTG GAT TTG GTT TCT GCA TAC ACA TTA AAT TCA ATG
Q   A   K   V   D   L   V   S   A   Y   T   L   N   S   M
TTT TGG GTT TAT TTG GCA ACC CAA GGA GTT AAT CCT AAG GAA CAT
F   W   V   Y   L   A   T   Q   G   V   N   P   K   F   H
CCA GTA AAA CAG GAA TTG GAA AGA ATC AGA GTA TAT ATG AAC AGA
P   V   K   Q   E   L   E   R   I   R   V   Y   M   N   R
GTC AAG GAA ATA ACA GAC AAG AAA AAG GCT GGC AAG CTG GAC AGA
V   K   E   I   T   D   K   K   K   A   G   K   L   D   R
GGT GCA GCT TCA AGA TTT GTA AAA AAT GCC CTC TGG GAA CCA AAA
G   A   A   S   R   F   V   K   N   A   L   W   E   P   K
TCG AAA AAT GCA TCA AAA GTT GCC AAT AAA GGA AAA AGT AAA AGT
S   K   N   A   S   K   V   A   N   K   G   K   S   K   S
TAA CTT TTT GGT TTT GAT GTA CAC ATA TTC AAA AAG TAC ATT AAT
ATG TAA TCA CAG TAA TAT GTA AAG CTA AAT ACT TCC TCT CCA AAG
ATC AAT TAT CTT TAT TGA TTA GCA CTG AGG ATT TTA ACA TTG TGA
TAT ATT ATA TAT TTA TAA TTT ACC ATC TCT TGA TGA GAC TCT TAT
TTC TTT ATA TAG GTC AGT CTT GCA AGT ACC ATT TTA TAA GCA GCT
GTG AAA TTT AAG TGA AAT GTT CTT TGT AAA CAT TTG TAC TAT TTT
AAA TGA ATA ATG ACC TTA TGA AGT ATG CTA TCT GTA GGC TGA AAT
TAT AGG TAC ATC TGT TTT CAC TAT ATG ATA TTA AGA AAG CGT GAA
ATG ACT TAA ATG TTC ATT TTT TTC TGT ATA GAT ACT TTA TCA TGT
TTT CAT GAT TTT AGG AAT TAC TGC TTT GTT GAT ATT CAA AGT GTG
AAA CTA AAA GTT TAT GGT TGT ACT TTA ATT CTT GGC ATG TTG CCT
CTA TGT CCC ATT TAA AAT AAA ATA CAT TCT CAT TAA CTT TAG ATG
GGA AAT AAG GTT GTA TGT TGA TGG ATG AAT TTT GGC ATG ATG ACT
GTA CTC TCA ATA AAG GCT GAA AAT GTT GTA AAA.....

```

Fig. 1

Nukleotidsequenz und Übersetzung der Maus-C1D cDNA

GAA GCC GTG TCA TGG CGT CAT CAT CGT GCG ACC TAT TTC CCG GAG CA
 ACA GGC GTC CAC GGT ATT GAG TTG GTC ACA ATG GCA GGT GAA GAA
 ATG AAT GAA GAT TAT CCC GTA GAA ATT CAC GAG TCT TTA ACA GCC
 M N E D Y P V E I H E S L T A
 CTG GAG AGC TCC CTG GGT GCT GTG GAC GAC ATG CTG AAG ACC ATG
 L E S S L G A V D D M L K T M
 ATG GCT GTT TCT AGA AAC GAG TTG TTG CAG AAG TTG GAC CCA TTG
 M A V S R N E L L Q K L D P L
 GAA CAA GCA AAG GTG GAT TTA GTT TCT GCA TAC ACC TTA AAT TCA
 E Q A K V D L V S A Y T L N S
 ATG TTT TGG GTT TAT TTG GCA ACT CAA GGA GTT AAT CCC AAA GAG
 M F W V Y L A T Q G V N P K E
 CAT CCA GTG AAG CAG GAA CTG GAA AGA ATC AGA GTC TAC ATG AAC
 H P V K Q E L E R I R V Y M N
 AGA GTT AAA GAA ATA ACA GAC AAG AAG AAG GCT GCC AAG CTG GAC
 R V K E I T D K K K A A K L D
 AGA GGT GCT GCT TCG AGA TTT GTC AAG AAG GCA CTC TGG GAA CCC
 R G A A S R F V K K A L W E P
 AAA CGA AAA AGC ACA CCA AAA GTG GCT AAT AAA GGG AAA AGC AAA
 K R K S T P K V A N K G K S K
 CAC TAA TCT TTT GGT TTT GAT GTA CAT GTT TTC AAA AAG TAC ATC
 H
 CTT TTT AAT CAG TTT ACA ATG TAG TTA TGT GAC CAT GTG GTG TTT
 AAA TGG ATT CCT TTT GGA ATT CAT GTA TAA ATT TAC ACA TTA CAT
 TTG TGA TAC TGA ATC TTT TTT TTG CTG AGA AAG ATT AAG TTG TCT
 TTG TTG ATT TTC ATA TAA AGC ATC ATG ATG TGT TTA ATA TTG TAA
 GAT ATT CTA TAA GCA GTT GTG AAA TCC AAA TGT TCT CTG TAA ACA
 TTT GTA GTG TTT GAA ATG AAC AAT GAT ATT ATG AAG TGT GCT ATC
 TGT AGA CCT CGA GGT GTA AGG ACA TTT GTT TTC AGT AAT GAT GAG
 AAA TAC AGT GAC TTA AAT ACC CAC TCT GTT TCT GTT CAG TTA GTT
 CAA CAT GTT TCG TGA TTT TTT TTT TTT TTT GAG TAA TTC TGT CTT
 GAT ATT CAA AGT CAA AAT TGA AAC CTT AAG GCT GTA CTT TAA TTC
 TTC ATG TTC CAT TTA AAA TAA AAT GTT CTC ATT AAC TCT GAT GGA
 AAA

Fig. 2

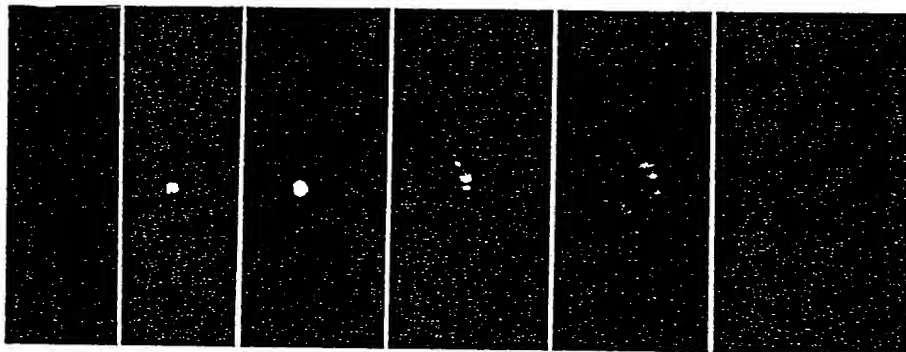


Fig. 3

4/4

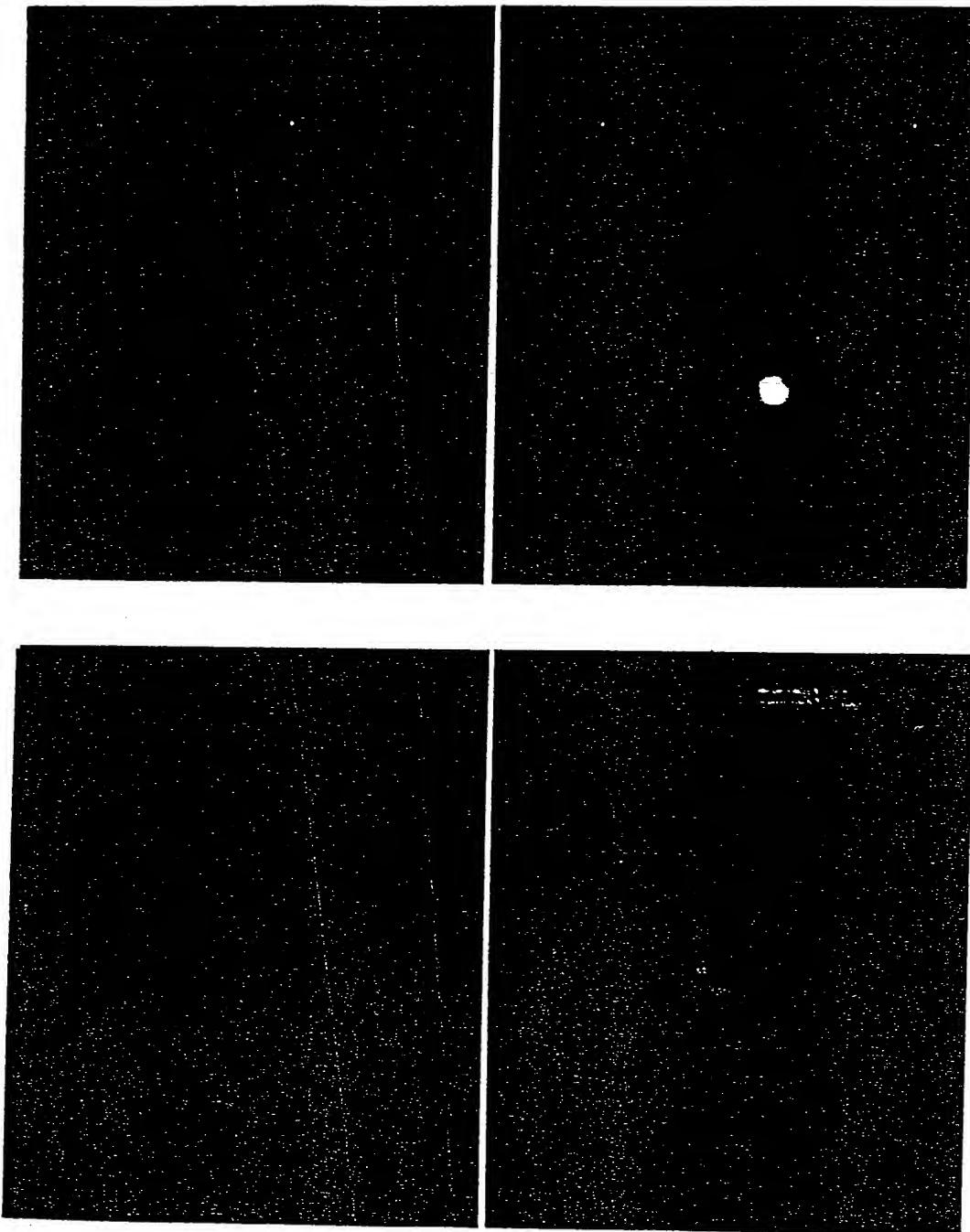


Fig. 4

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

- (i) ANMELDER:
 - (A) NAME: Deutsches Krebsforschungszentrum
 - (B) STRASSE: Im Neuenheimer Feld 280
 - (C) ORT: Heidelberg
 - (E) LAND: Deutschland
 - (F) POSTLEITZAHL: 69120
- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur Ausloesung von Apoptose in Zellen
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 10
- (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
 - (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
 - (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)
- (v) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:
 - noch nicht bekannt
- (vi) DATEN DER VORANMELDUNG:
 - ANMELDENUMMER: DE 198 24 811.3
 - ANMELEDTAG: 3-JUN-1998

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 1156 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 - (B) LAGE: 118..540
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
 - (B) LAGE: 118..540

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CTTTCCGGGA GACTGGAGTC GAAGGCCGTG AGTATTTTCT AAGCCAGTGT TTAGAGAGTA 60

TGTGAGGCAA GAGTACCTAT AGAACCCGGA GGAGGGTGAG GAGCAGAGCT GGCCATA 117

ATG-GCA GGT GAA GAA ATT AAT GAA GAC TAT CCA GTA GAA ATT CAC GAG 165
Met Ala Gly Glu Glu Ile Asn Glu Asp Tyr Pro Val Glu Ile His Glu
1 5 10 15

TAT TTG TCA GCG TTT GAG AAT TCC ATT GGT GCT GTG GAT GAG ATG CTG 213
Tyr Leu Ser Ala Phe Glu Asn Ser Ile Gly Ala Val Asp Glu Met Leu
20 25 30

AAG ACC ATG ATG TCT GTT TCT AGA AAT GAG TTG TTG CAG AAG TTG GAT 261
Lys Thr Met Met Ser Val Ser Arg Asn Glu Leu Leu Gln Lys Leu Asp
35 40 45

CCA CTT GAA CAA GCA AAA GTG GAT TTG GTT TCT GCA TAC ACA TTA AAT 309
Pro Leu Glu Gln Ala Lys Val Asp Leu Val Ser Ala Tyr Thr Leu Asn
50 55 60

TCA ATG TTT TGG GTT TAT TTG GCA ACC CAA GGA GTT AAT CCT AAG GAA 357
Ser Met Phe Trp Val Tyr Leu Ala Thr Gln Gly Val Asn Pro Lys Glu
65 70 75 80

CAT CCA GTA AAA CAG GAA TTG GAA AGA ATC AGA GTA TAT ATG AAC AGA 405
His Pro Val Lys Gln Glu Leu Glu Arg Ile Arg Val Tyr Met Asn Arg
85 90 95

GTC AAG GAA ATA ACA GAC AAG AAA AAG GCT GGC AAG CTG GAC AGA GGT 453
Val Lys Glu Ile Thr Asp Lys Lys Lys Ala Gly Lys Leu Asp Arg Gly
100 105 110

GCA GCT TCA AGA TTT GTA AAA AAT GCC CTC TGG GAA CCA AAA TCG AAA 501
Ala Ala Ser Arg Phe Val Lys Asn Ala Leu Trp Glu Pro Lys Ser Lys
115 120 125

AAT GCA TCA AAA GTT GCC AAT AAA GGA AAA AGT AAA AGT TAACTTTTGT 550
Asn Ala Ser Lys Val Ala Asn Lys Gly Lys Ser Lys Ser
130 135 140

GTTTTGATGT ACACATATTC AAAAAGTACA TTAATATGTA ATCACAGTAA TATGTAAAGC 610

TAAATACTTC CTCTCCAAAG ATCATTATCT TTATTGATTA GCACTGAGGA TTTTAACATT 670

GTGATATATT ATATATTTAT AATTTACCAT CTCTTGATGA GACTCTTATT TCTTTATATA 730

GGTCAGTCTT GCAAGTACCA TTTTATAAGC AGCTGTGAAA TTTAAGTGAA ATGTTCTTTG 790

TAAACATTTG TACTATTTTA AATGAATAAT GACCTTATGA AGTATGCTAT CTGTAGGCTG 850

AAATTATAGG TACATCTGTT TTCACTATAT GATATTAAGA AAGCGTGAAT GACTTAAATG 910

TTCATTTTTT TCTGTATAGA TACTTTATCA TGTTTTTCATG ATTTTAGGAA TTAGTGCTTT 970

GTTGATATTC AAAGTGTGAA ACTAAAAGTT TATGGTTGTA CTTTAATTCT TGGCATGTTG	1030
CCTCTATGTC CCATTTAAAA TAAAATACAT TCTCATTAAC TTTAGATGGG AAATAAGGTT	1090
GTATGTTGAT GGATGAATTT TGGCATGATG ACTGTACTCT CAATAAAGGC TGAAAATGTT	1150
GTAAAA	1156

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 141 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met	Ala	Gly	Glu	Glu	Ile	Asn	Glu	Asp	Tyr	Pro	Val	Glu	Ile	His	Glu	
1				5					10					15		
Tyr	Leu	Ser	Ala	Phe	Glu	Asn	Ser	Ile	Gly	Ala	Val	Asp	Glu	Met	Leu	
			20					25					30			
Lys	Thr	Met	Met	Ser	Val	Ser	Arg	Asn	Glu	Leu	Leu	Gln	Lys	Leu	Asp	
		35					40					45				
Pro	Leu	Glu	Gln	Ala	Lys	Val	Asp	Leu	Val	Ser	Ala	Tyr	Thr	Leu	Asn	
	50					55					60					
Ser	Met	Phe	Trp	Val	Tyr	Leu	Ala	Thr	Gln	Gly	Val	Asn	Pro	Lys	Glu	
65				70					75						80	
His	Pro	Val	Lys	Gln	Glu	Leu	Glu	Arg	Ile	Arg	Val	Tyr	Met	Asn	Arg	
				85					90					95		
Val	Lys	Glu	Ile	Thr	Asp	Lys	Lys	Lys	Ala	Gly	Lys	Leu	Asp	Arg	Gly	
			100					105					110			
Ala	Ala	Ser	Arg	Phe	Val	Lys	Asn	Ala	Leu	Trp	Glu	Pro	Lys	Ser	Lys	
		115					120					125				
Asn	Ala	Ser	Lys	Val	Ala	Asn	Lys	Gly	Lys	Ser	Lys	Ser				
130						135						140				

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 1040 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE:78..500

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
 (B) LAGE:78..500

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CAGAAGCCGT GTCATGGCGT CATCATCGTG CGACCTATTT CCCGGAGACA GCGTCCACG	60
GTATTGAGTT GGTGACA ATG GCA GGT GAA GAA ATG AAT GAA GAT TAT CCC	110
Met Ala Gly Glu Glu Met Asn Glu Asp Tyr Pro	
1 5 10	
GTA GAA ATT CAC GAG TCT TTA ACA GCC CTG GAG AGC TCC CTG GGT GCT	158
Val Glu Ile His Glu Ser Leu Thr Ala Leu Glu Ser Ser Leu Gly Ala	
15 20 25	
GTG GAC GAC ATG CTG AAG ACC ATG ATG GCT GTT TCT AGA AAC GAG TTG	206
Val Asp Asp Met Leu Lys Thr Met Met Ala Val Ser Arg Asn Glu Leu	
30 35 40	
TTG CAG AAG TTG GAC CCA TTG GAA CAA GCA AAG GTG GAT TTA GTT TCT	254
Leu Gln Lys Leu Asp Pro Leu Glu Gln Ala Lys Val Asp Leu Val Ser	
45 50 55	
GCA TAC ACC TTA AAT TCA ATG TTT TGG GTT TAT TTG GCA ACT CAA GGA	302
Ala Tyr Thr Leu Asn Ser Met Phe Trp Val Tyr Leu Ala Thr Gln Gly	
60 65 70 75	
GTT AAT CCC AAA GAG CAT CCA GTG AAG CAG GAA CTG GAA AGA ATC AGA	350
Val Asn Pro Lys Glu His Pro Val Lys Gln Glu Leu Glu Arg Ile Arg	
80 85 90	
GTC TAC ATG AAC AGA GTT AAA GAA ATA ACA GAC AAG AAG AAG GCT GCC	398
Val Tyr Met Asn Arg Val Lys Glu Ile Thr Asp Lys Lys Lys Ala Ala	
95 100 105	
AAG CTG GAC AGA GGT GCT GCT TCG AGA TTT GTC AAG AAG GCA CTC TGG	446

Lys Leu Asp Arg Gly Ala Ala Ser Arg Phe Val Lys Lys Ala Leu Trp
 110 115 120

GAA CCC AAA CGA AAA AGC ACA CCA AAA GTG GCT AAT AAA GGG AAA AGC 494
 Glu Pro Lys Arg Lys Ser Thr Pro Lys Val Ala Asn Lys Gly Lys Ser
 125 130 135

AAA CAC TAATCTTTTG GTTTTGATGT ACATGTTTTC AAAAAAGTACA TCCTTTTAA 550
 Lys His
 140

TCAGTTTACA ATGTAGTTAT GTGACCATGT GGTGTTTAAA TGGATTCCTT TTGGAATTCA 610

TGTATAAATT TACACATTAC ATTTGTGATA CTGAATCTTT TTTTGTCTGA GAAAGATTAA 670

GTTGTCTTTG TTGATTTTCA TATAAAGCAT CATGATGTGT TTAATATTGT AAGATATTCT 730

ATAAGCAGTT GTGAAATCCA AATGTTCTCT GTAAACATTT GTAGTGTTTG AAATGAACAA 790

TGATATTATG AAGTGTGCTA TCTGTAGACC TCGAGGTGTA AGGACATTTG TTTTCAGTAA 850

TGATGAGAAA TACAGTGA CTAAATACCCA CTCTGTTTCT GTTCAGTTAG TTCAACATGT 910

TTCGTGATTT TTTTTTTTTT TTGAGTAATT CTGTCTTGAT ATTCAAAGTC AAAATTGAAA 970

CCTTAAGGCT GTACTTTAAT TCTTCATGTT CCATTTAAAA TAAAATGTTC TCATTAATC 1030

TGATGGAAAA 1040

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 141 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Ala Gly Glu Glu Met Asn Glu Asp Tyr Pro Val Glu Ile His Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Thr Ala Leu Glu Ser Ser Leu Gly Ala Val Asp Asp Met Leu
 20 25 30

Lys Thr Met Met Ala Val Ser Arg Asn Glu Leu Leu Gln Lys Leu Asp
 35 40 45

Pro Leu Glu Gln Ala Lys Val Asp Leu Val Ser Ala Tyr Thr Leu Asn
 50 55 60

Ser Met Phe Trp Val Tyr Leu Ala Thr Gln Gly Val Asn Pro Lys Glu

100

100

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

GGGTCGACTT AACTTTTACT TTTTCCTTTA TTGGCAAC

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GGGGTACCAT GGCAGGTGAA GAAATGAATG AAGATTAT

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

GGGTCGACGT GTTTGCTTTT CCCTTTATTA GCCACTTT

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

GGGTCGACAT GGTGAGCAAG GGCGAGGAGC TGTTC

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

CCAAGCTTTG GAATTCTAGA GTCGCGGCCG CTTTA

35